
**СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ПРИБОРОВ
И ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ МЕТОДИК**

УДК 543.054, 543.062

© Д. Г. Петров, Е. Д. Макарова, И. Е. Антифеев, А. В. Бродская,
Н. Н. Константинова, С. Н. Малышин**ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОЛЕЙ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ НА ВЫХОД ДНК
ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ИЗ МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРОВ
НА ДВУОКИСИ КРЕМНИЯ. ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА**

Изучено влияние 2.65 МГц фокусированного ультразвукового поля на выход ДНК *M. tuberculosis* при использовании модельных растворов и коммерческих наборов для сорбции на силикатных микроколонках и на магнитных частицах в диапазоне интенсивности ультразвука 1.2÷3.0 Вт/см². Показано, что в обоих случаях (сорбция и в колонках, и на магнитных частицах) величина выхода сначала увеличивается пропорционально интенсивности ультразвукового поля, а после достижения максимума изменяется обратно пропорционально интенсивности. Максимальное значение выхода и при сорбции на микроколонках, и при сорбции на магнитных частицах составляет 82 % при интенсивности 2.0 Вт/см². Таким образом, выделение ДНК в 2 раза эффективнее, чем в отсутствие ультразвука, и на 10 % выше, чем при оптимальной температуре 70 °С. Визуальные наблюдения и фото-, видео-съемка позволили оценить структуру акустического поля и акустического течения при озвучивании суспензии магнитных частиц и ее изменение во времени при различных интенсивностях поля. Проведено краткое обсуждение влияния на сорбцию ДНК на микроколонке некоторых физических эффектов, возникающих при пропускании жидкости через пористые среды в ультразвуковом поле. На основе литературных данных и электрофореза оценена возможность фрагментации и деструкции молекул ДНК в изученных условиях. Разрушение плазмиды происходило при значениях интенсивности около 3.0 Вт/см² и только при озвучивании в течение времени более 1 мин. Сделан вывод, что выбор одной из двух исследованных сорбционных систем определяется скорее удобством использования и наличия у пользователя, чем рабочими характеристиками.

Кл. сл.: нуклеиновые кислоты, влияние ультразвука, выделение ДНК, очистка ДНК, концентрирование ДНК, диоксид кремния, двуокись кремния

ВВЕДЕНИЕ

Основным узким местом во многих методах аналитической и молекулярной диагностики является приготовление образца, поэтому существует огромная потребность в простых и быстрых методах выделения целевых соединений из сложных биологических образцов. Кроме того, при молекулярной диагностике необходимо получение нуклеиновых кислот (НК), свободных от белков и других загрязняющих веществ, являющееся необходимым условием для применения многих методов молекулярной биологии. В последние десятилетия методы магнитной сепарации с применением магнитных частиц или матриц, покрытых сорбирующими материалами, все чаще применяются для выделения и очистки геномной и плазмидной ДНК в стационарных или проточных условиях, включая использование готовых наборов [1–4]. Однако проблемы, возникающие при перемешивании малых объемов суспензий частиц в стационарных условиях в процессе сорбции/элюирования, требуют применения новых под-

ходов.

Для повышения скорости и эффективности выделения НК из растворов могут использоваться эффекты, вызванные действием ультразвука, такие как возникновение акустической радиационной силы и акустическое течение [5–7]. В ультразвуковых полях стоячих волн (УЗСВ) радиационная сила перемещает частицы в определенные области поля, образуя слои частиц на расстояниях половины длины волны, и позволяет удерживать их во взвешенном состоянии против действия силы тяжести в стационарном режиме или против сил увлечения потока в проточном режиме. Так, удерживание частиц в узлах УЗСВ в сочетании с потоком жидкости, содержащей целевой компонент, через частицы использовано для ускорения реакций между компонентами раствора и частицами [8]. Метод концентрирования НК с помощью акустической радиационной силы предложен в работе [9]: создание поля УЗСВ в камере, содержащей смесь водных растворов ДНК с 70 % этанолом и NaCl, приводит к образованию крупных кластеров ДНК в узлах давления.

В свою очередь акустическое течение, т. е. стационарный поток жидкости, формируемый вязким затуханием акустической волны, позволяет осуществлять неконтактное перемешивание жидкости (при скоростях течения от мкм/с до см/с) [7, 10].

Запатентовано применение ультразвука в комплексном методе экстракции и очистки биологических клеток, в частности, перед анализом методом ПЦР таких материалов, как кровь или почва [11]. Метод основан на удерживании клеток в узлах давления и вымывании потоком жидкости веществ, затрудняющих проведение реакции ПЦР. После лизиса клеток извлечение ДНК с помощью частиц (размером 1–50 мкм) ускоряют акустическим течением.

Метод выделения генетических и других материалов из растворов на частицах, находящихся во взвешенном состоянии, созданном с помощью фокусированного ультразвука, может использоваться как в стационарном, так и в проточном режимах [12]. Важно, что для обработки образцов могут применяться любые контейнеры — полимерные мешочки и ячейки, гидрофобные мембраны, микропробирки и т. д. Автор [12] отмечает, что фокусированный ультразвук позволяет вызывать перемешивание, кавитацию, нагревание или разрушение материалов (например, фрагментацию молекул ДНК), ускорение связывания веществ с подложками, а также лизис клеток, дезагрегирование частиц, охлаждение, создание потока в канале и даже стерилизацию образца. Фокусированная энергия у границы жидкость/стенка создает контролируемую локальную турбулентность без увеличения объемного потока, ускоряя желательные процессы [12].

Для концентрирования целевых соединений, присутствующих в очень малых количествах, на частицах предлагается применять и ультразвуковое поле (УЗП), и магнитное поле (МП) в проточном режиме из объемов образца от 10 до 500 мл (при ультразвуковом перемешивании) [13]. В работе [14] описан метод динамической экстракции ДНК из образцов окружающей среды на суспензионной колонке, содержащей магнитные частицы, с использованием УЗП и МП, и показана возможность концентрирования ДНК (плазмиды *M. tuberculosis*) из больших объемов воды и почвенных экстрактов (≥ 100 мл). (Взвешенное состояние сорбента в УЗСВ в потоке позволяет интенсифицировать процесс сорбции благодаря акустическим микропотокам, а МП на выходе из колонки удерживает мелкие частицы сорбента внутри колонки [14]).

Сочетание МП с УЗСВ позволяет обрабатывать от 1 до 10 мл образца в камере с магнитными частицами [15]. Циклические изменения силы, или УЗСВ, или МП помогают промывать частицы, пе-

ремешая их через жидкость. Использование УЗП для ресуспендирования частиц после захвата их МП преодолевает один из недостатков магнитной сепарации — образование сгустков частиц в МП и плохое ресуспендирование. Метод пригоден для выделения биовеществ, в том числе ДНК. Сочетание УЗП и МП предложено и в патенте [16], причем в одном варианте УЗП используют для перемешивания частиц, облегчая захват ДНК, а в другом варианте — для ресуспендирования магнитных частиц в процессе промывания и элюирования. Сочетание УЗП, МП и гравитационных сил применяют для концентрирования из мокроты бактерий туберкулеза, предварительно меченых соединениями Fe (II) [17]: резонансное УЗП ускоряет формирование многочисленных агрегатов, образованных мечеными бактериями и сферами. При выключении УЗП агрегаты быстро оседают, позволяя вымыть надосадочную жидкость, а при повторном включении поля агрегаты снова переводят во взвешенное состояние и выполняют дальнейшие циклы промывания [17].

Многообразие эффектов УЗП не только увеличивает эффективность и скорость извлечения ДНК частицами, но и позволяет высвобождать ДНК из твердых сред — с FTA[®] покрытием, частиц SiO₂, стекловолокна, магнитных частиц и т. п. [18]. Это особенно удобно для высвобождения генетического материала при детектировании НК методом микрофлюидной ПЦР, т. к. еще одним преимуществом является фрагментация ДНК с помощью акустической энергии [18]. Показано, что высвобождение ДНК при озвучивании происходит в виде фрагментов в течение секунд и на порядок величины больше, чем при традиционном элюировании. Авторами [19] отмечается, что при выделении НК на фильтрующих колонках трудно элюировать все связанные НК, используя маленькое количество элюента, поэтому для облегчения процесса можно применять ультразвук, разрушающий в элюенте комплекс НК и подложки (например, в случае спин-колонок Qiagen).

В патенте [20] описаны два варианта использования ультразвука для сбора НК из частиц (волокон SiO₂, нейлона и т. п.). В одном варианте УЗП применяется для разрезания и больших молекул НК, и больших частиц до очень маленьких размеров перед стадией или в процессе стадии связывания НК с поверхностью. Другой вариант включает разрушение поверхности частиц перед элюированием связанных НК, обеспечивая лучшее смачивание поверхности и более легкую диффузию молекул НК от сорбирующей поверхности.

В предыдущей работе [21] нами изучено влияние температуры на выход ДНК *M. tuberculosis* на коммерческих микроколонках и показано, что эффективность выделения при 70 °С на 50 % выше,

чем при комнатной температуре. Влияние же УЗП на сорбцию ДНК на микроколонках, насколько нам известно, практически не исследовалось, хотя и указывается на возможность применения фокусированного ультразвука для облегчения сорбции [12] и элюирования [18–20] генетического материала при использовании микроколонок. Известно, однако, что воздействие УЗП на процесс диффузии в гетерогенных системах может изменять условия переноса веществ как в объеме раствора и диффузионном слое, так и в пористой среде, и этот эффект должен зависеть от параметров и диффузионной системы, и звукового поля [22]. Поэтому при разработке каждого конкретного метода следует определять оптимальные условия: частоту и интенсивность УЗП, длительность воздействия и влияние этих параметров на молекулы НК.

Целью данной работы является сравнительное изучение влияния интенсивности 2.65 МГц фокусированного ультразвука на выход ДНК при использовании коммерческих наборов, разработанных в ЗАО "Синтол" (г. Москва) на основе микроколонок и магнитных частиц для выделения плазмиды *M. tuberculosis*. Мегагерцовая частота выбрана для уменьшения вероятности появления кавитационных эффектов, которые могут приводить к быстрой фрагментации и/или даже разрушению молекул ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В качестве модельного использовали раствор плазмидной ДНК *M. tuberculosis* концентрации $1 \cdot 10^7$ копий/мкл, входящий в состав коммерческого набора "Ампли-Туб-РВ" (ЗАО "Синтол"). Для выделения ДНК применяли микроколонки со стекловолоконной мембраной NucleoSpin и магнитные частицы, покрытые силикагелем, входящие в состав наборов "К-Сорб-Туб" и "М-Сорб-Туб" соответственно, предоставленные ЗАО "Синтол". (Диапазон размеров магнитных частиц 20–100 мкм). Рабочий раствор ДНК концентрации $1 \cdot 10^5$ копий/мкл готовили методом последовательного разбавления, применяя для этой цели "Лизирующий реагент" (ЛР) из набора "М-Сорб-Туб" в случае магнитных частиц и ЛР из набора "К-Сорб-Туб" при использовании микроколонок. (Раствор ЛР предназначен в общем случае для проведения лизиса клеточного материала и создания оптимальных условий при последующей сорбции ДНК).

При количественном определении ДНК использовали реагенты, входящие в состав набора для проведения ПЦР-РВ "Ампли-Туб-РВ" (ЗАО

"Синтол"): праймеры, зонды, олигонуклеотиды, буфер, хлорид магния. Режим амплификации соответствовал рекомендациям производителя (инструкции к набору "Ампли-Туб-РВ").

Оборудование

Для изучения влияния условий озвучивания на эффективность выделения ДНК использовали установки, созданные на базе "Акустического фильтра" производства ИАП РАН (патент РФ № 2393907). Специальное программное обеспечение, разработанное под систему Windows, позволяет варьировать интенсивность УЗ-поля в диапазоне от 0.5 Вт/см² до 3.0 Вт/см² и задавать частоту в интервале от 2.5 до 3 МГц. Частота в этих сериях опытов составляла 2.65 МГц. Влияние интенсивности ультразвука на сорбцию ДНК изучали в диапазоне 1.2–3.0 Вт/см², изменяя интенсивность с шагом 0.2 Вт/см². Схемы установок представлены на рис. 1.

Интенсивность УЗ-поля определяли с помощью метода дифференциальной термопары [23, 24], при котором сохраняется линейная зависимость разности температур спаев от интенсивности ультразвука вплоть до интенсивности 3 Вт/см² [24]. Калибровку производили трехкратно, измерение проводили вблизи дна, внутри кюветы, при комнатной температуре.

Известно, что полезной визуализацией ультразвукового "луча" и распределения его энергии в различных зонах, является метод "пылевой картины", основанный на оценке расположения частиц в ультразвуковом поле и позволяющий выяснить структуру поля и ее изменение во времени [25]. Для визуализации акустического течения и эффективности перемешивания обычно используются латексные флуоресцентные частицы с размерами ≤ 1 мкм или молекулы красителя. Поэтому оценку состояния системы (раствор ДНК—магнитные частицы) в ультразвуковом поле при изменении интенсивности ультразвука проводили по характеру распределения частиц и красителя "метиленовый голубой" в объеме суспензии визуально, а также с помощью фото- и видеорегистрации, используя фотоаппарат Canon EOS 700D, в режиме макросъемки.

Температуру в пробе с магнитными частицами после озвучивания в течение 1 с измеряли с помощью откалиброванной Al-Cr термопары (стандартной термопары "К-типа") в фокусе (на дне кюветы) и вблизи стенок кюветы у дна и посередине объема озвучиваемой пробы. Измерение проводили в первые три секунды после выключения ультразвука. Исходная температура воды 23 °С.

Перемешивание растворов и суспензий на всех стадиях экспериментов выполняли с помощью микроцентрифуги-встряхивателя "Циклотемп-901".

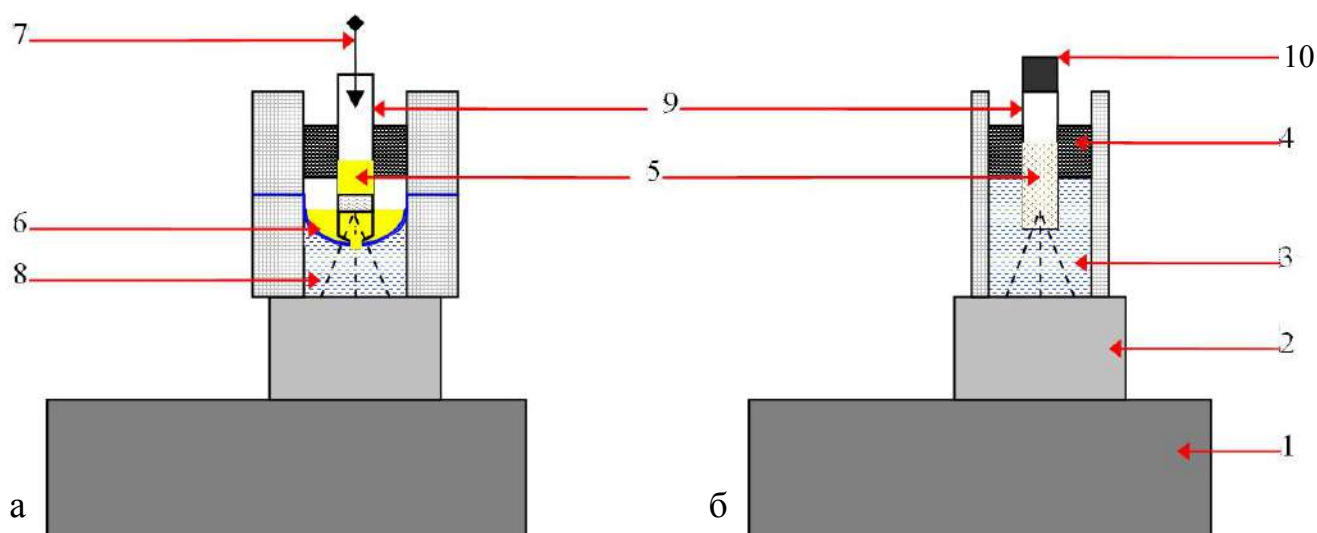


Рис. 1. Схемы установок для опытов с микроколонок (а) и с магнитными частицами (б).

1 — блок управления УЗ-излучением; 2 — УЗ-излучатель; 3 — дистиллированная вода; 4 — материал для фиксации колонки (кювета); 5 — проба, содержащая НК; 6 — кювета для сбора пробы после пропускания через микроколонок; 7 — устройство подачи пробы (например, инсулиновый шприц); 8 — УЗ-излучение; 9 — микроколонок / кювета; 10 — пробка

Анализ методом ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 (производства ИАП РАН) [26]. Для электрофореза ДНК после озвучивания использовали камеру BluePippin (Sage Science), 1 × TBE буфер, 1 % гель агарозы (Sigma). Для фотографирования геля применяли "Гель-документирующую систему BioRad ChemiDoc MP" (США). Режим получения — стандартный для гелей с бромистым UV-Vis.

Методика экспериментального исследования

Для приготовления исследуемых проб в 800 мкл ЛР добавляли 200 мкл рабочего раствора ДНК и тщательно перемешивали. Таким образом, концентрация ДНК в растворе пробы составляла $2 \cdot 10^4$ копий/мкл. (В каждую партию растворов при выделении ДНК включали отрицательный контроль выделения, что позволяло оценить возможность загрязнения на этапе выделения). Далее каждую пробу (при каждой интенсивности УЗ) подвергали следующим манипуляциям.

Стадии выделения ДНК на магнитных частицах

1. Для сорбции исследуемую пробу помещали в стеклянную кювету объемом 2 мл, добавляли 20 мкл суспензии сорбента и 500 мкл ОР-Туб. После тщательного перемешивания содержимого кюветы помещали ее в ультразвуковую установку (рис. 1, б). Включали ультразвук при заданной ин-

тенсивности, затем прекращали озвучивание и извлекали кювету. Подносили к стенке кюветы вплотную магнит. Выдерживали в течение 1 мин. Не убирая магнит, аккуратно удаляли жидкость дозатором на 1000 мкл. В контрольных опытах перемешивание происходило каждые 20 с, согласно методике, рекомендуемой ЗАО "Синтол".

2. Для промывания вносили в кювету 500 мкл промывочного раствора № 1 (из набора "М-Сорб-Туб") и перемешивали содержимое кюветы до равномерного распределения сорбента. Выделяли магнитные частицы, как и в п. 1. Аналогичные процедуры проводили с промывочными растворами № 2 и № 3 из этого же набора.

3. Для десорбции добавляли в кювету с частицами 200 мкл элюирующего раствора и тщательно перемешивали. Выдерживали кювету в течение 10–15 мин при температуре 75 °С, периодически перемешивая. Подносили к кювете вплотную магнит. Выдерживали в течение 1 мин. Не убирая магнит, аккуратно собирали жидкость дозатором на 250 мкл. Для определения концентрации ДНК отбирали дважды по 10 мкл элюата и проводили анализ методом ПЦР-РВ с использованием калибровочных образцов на приборе АНК-32 ($n = 2$).

Стадии выделения ДНК на микроколонок

1. 1 мл пробы в инсулиновом шприце (без иглы) плавно выдавливали в течение 1 мин в микроколонок, закрепленную в ультразвуковой установке,

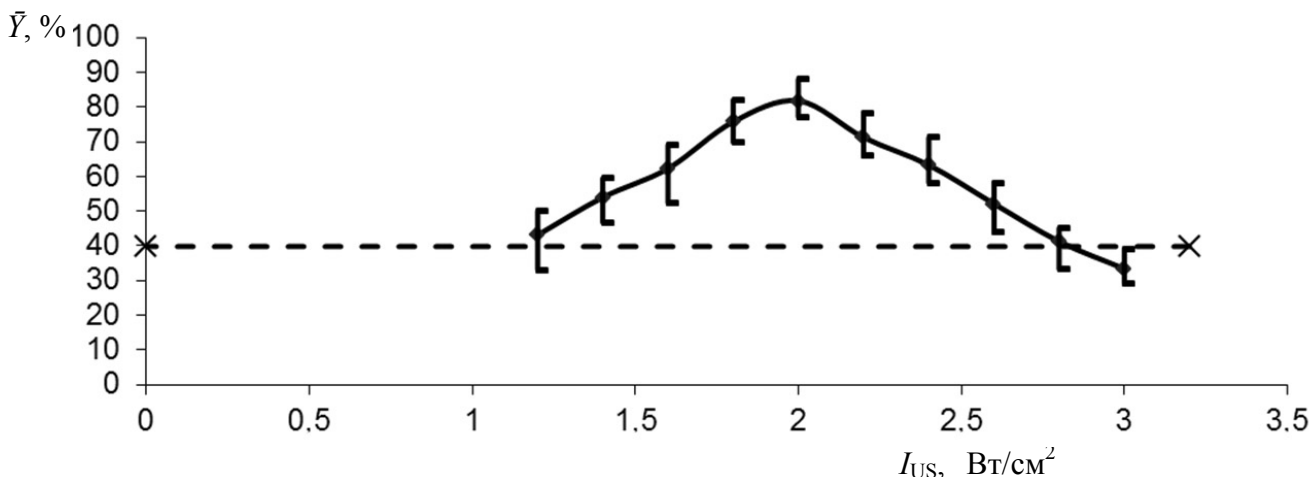


Рис. 2. Зависимость величин выхода ДНК от интенсивности ультразвука при сорбции на микроколонке.
 - - - выход ДНК без воздействия УЗ; — выход ДНК при различной интенсивности УЗ-воздействия

Табл. 1. Влияние интенсивности ультразвука (I_{US}) на выход ДНК при сорбции на микроколонке при комнатной температуре 20 ± 2 °С. Время озвучивания 1 мин (число параллельных измерений $n = 10$)

Характеристика выхода ДНК	$I_{US}, \text{Вт/см}^2$										
	0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0
$\bar{Y} = \bar{c}_i / c_0 \times 100, (\%)$	38.9	43.1	54.0	62.3	75.8	81.8	71.2	63.3	52.1	41.2	33.4
s	5.2	4.9	4.7	5.4	4.0	3.6	4.3	4.2	5.0	4.2	3.3
$s_r (\%)$	9.4	11.3	8.7	8.7	5.2	4.4	6.1	6.7	9.6	10.1	9.8
$\pm \Delta \bar{c}_i$	3.2	3.5	3.4	3.9	2.9	2.6	3.1	3.0	3.6	3.0	2.4

как показано на рис. 1, а, следя за тем, чтобы все содержимое шприца прошло через микроколонку. (Для каждого опыта использовали новый шприц). Включали ультразвук при требуемой интенсивности, после чего начинали вводить пробу, при этом лизирующий буфер заполнял объем до мембраны в колонке снизу, как показано на рис. 1, для обеспечения передачи ультразвука на мембрану колонки.

2. Остальные стадии выполняли в соответствии с рекомендациями производителя набора, подробно описанными в предыдущей работе, посвященной изучению влияния температуры на выход НК при сорбции на микроколонке [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние интенсивности ультразвука на выход НК при сорбции на микроколонках

Микроколонку помещали в ультразвуковую установку так, чтобы фокус ультразвукового поля

(УЗП) находился по центру мембраны колонки. Никаких визуально наблюдаемых изменений при пропускании пробы через микроколонку при интенсивностях ультразвука в диапазоне 1.2–2.4 Вт/см² не происходило. При увеличении интенсивности до значений ≥ 2.6 Вт/см² наблюдали интенсивное выделение пузырьков воздуха — увеличение размеров пузырьков и скорости их движения к поверхности симбатно росту интенсивности. Раствор после прохождения через мембрану при высоких интенсивностях становился мутным из-за образования большого количества мелких пузырьков, а при отстаивании в течение минуты постепенно приобретал прозрачность.

Средние значения величин выхода НК ($\bar{Y}, \%$) для каждой серии опытов при различных интенсивностях ультразвука приведены в табл. 1. Здесь и далее: $\bar{Y} = (\bar{c}_i / c_0) \times 100$, c_0 — исходная концентрация ДНК в растворе, \bar{c}_i — средняя концентрация ДНК в растворе после завершения циклов сорбции и элюирования, рассчитанная по резуль-

татам 10 параллельных измерений, s — выборочное стандартное отклонение, s_r — относительное стандартное отклонение.

Воспроизводимость в этих сериях экспериментов отражает воспроизводимость условий на всех стадиях выделения НК; абсолютные значения s значимо не отличаются в исследованном диапазоне интенсивностей и в данном случае являются приемлемыми с точки зрения определения характера зависимости \bar{Y} от интенсивности ультразвука. (Сравнение величин s в контрольных опытах и в опытах с озвучиванием показывает, что УЗП не влияет на воспроизводимость условий опытов). График зависимости средних значений выхода НК от интенсивности ультразвука представлен на рис. 2. Видно, что при интенсивности 1.2 Вт/см² выход НК увеличивается крайне незначительно по сравнению с выходом в отсутствие УЗП, тогда как при дальнейшем увеличении I_{US} величина \bar{Y} быстро возрастает пропорционально значениям I_{US} , а после достижения максимума изменяется обратно пропорционально интенсивности. В диапазоне 1.2÷2.0 Вт/см² изменение средних значений выхода НК можно аппроксимировать зависимостью $\bar{Y} = 49.58 + 15.92 \times I_{US}$ (коэффициент корреляции $r = 0.96$), причем выход НК возрастает до 82 % при $I_{US} = 2.0$ Вт/см², т. е. в 2 раза по сравнению с выходом без УЗП. (Максимальная величина выхода почти на 10 % больше, чем достигнутая при оптимальной температуре 70 °С [21]). В диапазоне $I_{US} = 2.0 \div 3.0$ Вт/см² выход НК можно аппроксимировать зависимостью $\bar{Y}_i = 179.79 - 49.04 \times I_{US}$, ($r = 0.97$), причем выход НК при $I_{US} = 3.0$ Вт/см² примерно на 6 % меньше, чем при сорбции без УЗП.

Следует отметить, что в общем случае взаимодействие ультразвука с пористой средой носит сложный, до сих пор не изученный полностью характер и сопровождается целым рядом эффектов, одним из которых является акустическое течение. Так, например, ускорение диффузии через толстые крупнопористые мембраны может объясняться возникновением в порах акустических микропотоков (особенно у краев и изгибов самих пор) при продавливании жидкости через капилляры мембран [22]. Способность ультразвука вызывать перемешивание в чрезвычайно малых объемах, описанное как "внутриклеточное перемешивание", относили к одному из наиболее характерных эффектов ультразвука [27]. Моделирование показало, что акустическое течение, возникающее вследствие затухания звука в модельном пористом материале, может увеличивать скорость диффузии [28].

В работе [29] перечислены возможные эффекты ультразвука при действии на пористые среды, приводимые в разных работах: уменьшение сцеп-

ления между стенкой поры и жидкостью, акустическое течение, увеличение температуры, акустическая кавитация, турбулентность внутри пор, уменьшение вязкости и перистальтический транспорт жидкости, вызванный деформацией стенок поры и т. д. Однако, по мнению авторов [29], не существует никакой определенности в вопросе о том, какой из механизмов является правильным; позднее при экспериментальном и теоретическом исследовании влияния УЗП на течение через пористые среды этими же авторами установлено, что наиболее важными являются уменьшение вязкости и акустическое течение [30].

При изучении влияния УЗП на адсорбцию частицами микропористых смол, находящихся в объеме раствора, сделаны следующие выводы:

- 1) ультразвук лучше проникает в микропоры при более высоких частотах;
- 2) усиление массопереноса в порах вызвано турбулентностью и микроструями;
- 3) ультразвук усиливает диффузию в порах при сорбционных процессах и способствует десорбции адсорбированных молекул, причем оба эффекта усиливаются при увеличении частоты и интенсивности УЗП [31].

Использование акустических потоков в пористых материалах легло в основу метода, позволяющего достичь более чем 20-кратного ускорения смешивания двух фаз по сравнению с естественной диффузией при частотах 1–20 МГц [32].

Помимо указанных механизмов устранения диффузионных ограничений, увеличение выхода НК в диапазоне 1.2–2.0 Вт/см² может быть обусловлено постепенным высвобождением воздуха из пор при озвучивании, приводящим к увеличению площади и улучшению контакта между пробой и стенками пор. (Известно, что пузырьки воздуха остаются в порах фильтров длительное время при фильтровании жидкости и трудно удаляются, поэтому для их удаления предложен метод обработки фильтров ультразвуком с частотой 800–2000 кГц [33]). Если принять во внимание, что объемная скорость в наших опытах принудительно поддерживается на постоянном уровне (время продавливания пробы составляет 1 мин), а площадь поперечного сечения, занимаемого пробой в каналах, при постепенном выделении воздуха уменьшается, можно полагать, что линейная скорость продвижения пробы через колонку непрерывно растет. Увеличение скорости до некоторого предела должно сопровождаться увеличением сорбции НК, тогда как неизбежное возникновение турбулентности при все более энергичном выделении пузырьков должно привести к уменьшению извлечения НК из пробы. Такое объяснение вида полученной зависимости — увеличение выхода НК при увеличении интенсивности УЗП с после-

дующим уменьшением согласуется с литературными данными о влиянии скорости потока на эффективность сорбции НК. Так, изучение условий сорбции λ -ДНК в проточном режиме на микрочипе, заполненном частицами SiO_2 , показало, что при увеличении скорости потока эффективность выделения проходит через максимум с последующим ее резким снижением [34]. О значительном (четырёхкратном) уменьшении адсорбции при увеличении скорости потока от 1 до 4 мл/мин в колонке на основе диатомита сообщается в работе [35].

Кроме того, известно, что прохождение плазмиды через поры ультрафильтрационных мембран увеличивается при увеличении потока вследствие индуцированного им удлинения молекулы [36], что в нашем случае может приводить к "проскоку" НК по мере увеличения интенсивности УЗП (и следовательно, скорости потока) выше некоторого порогового значения. Экспериментальная проверка показала, что при выделении плазмидной ДНК *M. Tuberculosis* на микроколоне при интенсивностях ультразвука до 1.8 Вт/см^2 проскок составляет около 15–20 %, в диапазоне $1.8\text{--}2.6 \text{ Вт/см}^2$ снижается до 5–10 %, а при более высокой интенсивности проскок может достигать до 50 % целевого продукта. (Оценка "необратимой" сорбции, т. е. количества ДНК, которая не элюируется на последней стадии выделения, показала, что при 1.2 и 3.0 Вт/см^2 необратимая сорбция отсутствует, а при интенсивности 2.0 Вт/см^2 составляет всего 1–2 %).

В то же время при объяснении наблюдаемого уменьшения выхода НК при высоких интенсивностях УЗП нельзя полностью исключить вероятность фрагментации и/или дегградации НК. О такой возможности свидетельствуют литературные данные, согласно которым введение небольшого количества тепловой энергии приводит к 10-кратному уменьшению давления, необходимого для гидродинамической фрагментации ДНК [37], а сочетание сдвиговой силы и границы воздух—жидкость вызывает интенсивную дегградацию плазмидной ДНК [38]. Кроме того, предложен гидродинамический метод фрагментации ДНК с помощью фильтрующего сита с однородными порами (наиболее важными параметрами являются скорость потока и размер пор) [39]. Показана принципиальная возможность фрагментации ДНК в растворе при барботаже пузырьками азота (результат зависит от количества пузырьков, создаваемых в единичном объеме) [40]. Изложен принцип фрагментации ДНК [41], основанный на создании тупиковых каналов, удерживающих воздух при протекании жидкости через полости, и озвучивании системы. (При этом колеблющаяся межфазная поверхность воздух—жидкость создает

поток вихреобразного микротечения внутри локальной области окружающей жидкости [42]).

Влияние интенсивности ультразвука на выход НК при сорбции на магнитных частицах

Влияние интенсивности ультразвука на структуру поля и акустического течения

Визуальные наблюдения и анализ изображений, полученных при видеосъемке, позволили оценить влияние интенсивности ультразвука на структуру поля и акустического течения (см. Приложение, рис. П).

После включения ультразвука частицы постепенно переходили во взвешенное состояние, начиная от взмучивания наиболее мелких частиц в центре кюветы (рис. П, а, е) до появления слоев частиц (рис. П, б, в), свидетельствующих об образовании поля стоячей волны в диапазоне $2.0\text{--}2.4 \text{ Вт/см}^2$ (рис. П, г). Однако при $I_{\text{US}} \geq 2.8 \text{ Вт/см}^2$ возникали вихревые потоки жидкости и циркуляции, разрушающие слои и активно перемещающие частицы по всему объему кюветы (рис. П, д, з). На рис. П, ж, наблюдается перемещение красителя от дна кюветы к поверхности и постепенное распространение по всему объему пробы при интенсивности ультразвука $2.0\text{--}2.4 \text{ Вт/см}^2$.

Крупные магнитные частицы при любой интенсивности УЗП в диапазоне $1.2\text{--}3.0 \text{ Вт/см}^2$, уже перешедшие во взвешенное состояние, спустя некоторое время после начала излучения (10–20 с) оседали на дно кюветы (на фото видно, что при $1.4\text{--}1.6 \text{ Вт/см}^2$ основная масса частиц лежит на дне).

При действии ультразвука наблюдали возникновение возмущений на поверхности жидкости: на границе раздела жидкость—воздух возникала выпуклость по центру, высота которой от едва заметной при $I_{\text{US}} \leq 1.8 \text{ Вт/см}^2$ увеличивалась по мере повышения интенсивности, превращаясь в фонтан при 3.0 Вт/см^2 .

Обобщение результатов позволяет сделать вывод о неравномерности УЗП внутри кюветы, т. е. при $I_{\text{US}} < 1.8 \text{ Вт/см}^2$ мы наблюдаем поток красителя и частиц, направленный вертикально вверх, а при увеличении интенсивности возникал поток красителя, распространяющийся от центра кюветы к краям, при этом у дна кюветы движение частиц было минимальным, что, вероятно, связано с их размером и массой. Интенсивность течений пропорциональна интенсивности ультразвука.

Из фотографий прежде всего следует, что при интенсивностях ультразвука в интервале $1.4\text{--}1.6 \text{ Вт/см}^2$ не все частицы переходят во взвешенное состояние (есть только взмучивание, по видимому, самых мелких частиц, которые переносятся к поверхности жидкости по центру кюветы).

Эффекты согласуются с литературными данными, позволяя дать интерпретацию процессов.

Так, например, высота подъема жидкости на свободной поверхности зависит от интенсивности ультразвука и обусловлена возникновением резонанса в исследуемом столбике жидкости [25], что приводит к значительному усилению амплитуды колебаний (и следовательно, радиационной силы и акустического течения). Многократное увеличение радиационной силы при резонансе должно вызывать не только переход во взвешенное состояние крупных тяжелых частиц, но и образование агрегатов микросфер с уменьшением доступной для сорбции поверхности. В работах [43, 44] возмущенное состояние поверхности объясняют появлением дополнительного конвективного течения, вызывающего нестабильное отражение ультразвука. При интенсивном УЗП эти возмущения могут перерасти в ультразвуковой фонтан с появлением струйных потоков и разбрызгивания жидкости [25, 45, 46].

На поведение частиц и молекул влияют и несколько типов акустического течения, которые отличаются по пространственному масштабу: Экарта ("кварцевый ветер") — движение по всему объему; Рэлея — вихревое течение снаружи пограничного слоя; Шлихтинга — вихревое течение внутри пограничного слоя на межфазной границе жидкость—твердое тело [47, 48]. Эти течения уменьшают диффузионный слой и увеличивают скорость и эффективность массопереноса в гетерогенных системах, ускоряя извлечение компонентов благодаря хорошему перемешиванию растворов [49, с. 377–385], [50]. В то же время течение Шлихтинга может перемещать частицы в объеме раствора под действием силы Стокса, предотвращать агрегацию или даже разрушать агрегаты — в зависимости от интенсивности ультразвука, увеличение которой увеличивает его скорость [51]. Непосредственное определение изменения скорости акустического течения во времени пока-

зало [52], что скорость течения вдоль оси луча увеличивается монотонно, достигая стационарного значения, пока I_{US} остается низкой. Однако на дальнем расстоянии от преобразователя процесс установления занимает много времени, и в ряде случаев наблюдаются выбросы в изменениях скорости, а при более высоких I_{US} скорость увеличивается быстро и проявляется аномальное поведение в виде возникновения плато и максимумов [52].

Зависимость выхода НК от интенсивности ультразвука

Средние значения величин выхода НК (\bar{Y} , %) при использовании магнитных частиц в зависимости от интенсивности ультразвука приведены в табл. 2 и на рис. 3. Как и в случае сорбции на микроколонке, средние значения выхода НК сначала растут при увеличении интенсивности ультразвука, а после достижения максимального значения (82 % при интенсивности 2.0 Вт/см²) быстро уменьшаются. В диапазоне интенсивностей 1.2–2.0 Вт/см² изменение средних значений выхода ДНК аппроксимировано линейной зависимостью $\bar{Y} = 16.88 + 32.28 \times I_{US}$ ($r = 0.91$), несмотря на "волнообразный" характер начального участка кривой. Волнообразный характер кривой можно объяснить переходными процессами, при которых поведение частиц в растворе может быть нестабильно и приводить как к большому количеству "положительных", так и "отрицательных" выбросов в скорости массопереноса; данное явление воспроизводится, тем самым мы исключаем вероятность случайной ошибки.

При дальнейшем повышении интенсивности происходит уменьшение эффективности выделения НК, что аппроксимировано линейной зависимостью $\bar{Y} = 128.25 - 23.31 \times I_{US}$ ($r = 0.92$).

Табл. 2. Влияние интенсивности ультразвука (I_{US}) на выход ДНК при сорбции на магнитных частицах при комнатной температуре (20 ± 2 °C). Время озвучивания 1 мин (число параллельных измерений $n = 10$)

Характеристика выхода ДНК	I_{US} , Вт/см ²										
	0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0
$\bar{c}_i / c_0 \times 100$ (%)	39.8	54.4	66.9	63.2	76.2	82.0	75.0	73.9	67.7	63.5	57.5
s	2.2	3.4	1.8	2.0	2.3	3.2	4.2	3.4	2.0	3.5	4.4
s_r (%)	5.2	6.2	2.7	3.1	3.0	4.0	5.6	4.6	2.9	5.5	7.6
$\pm \Delta \bar{c}_i$	1.8	2.4	1.3	1.4	1.6	2.3	3.0	2.4	1.4	2.5	3.1

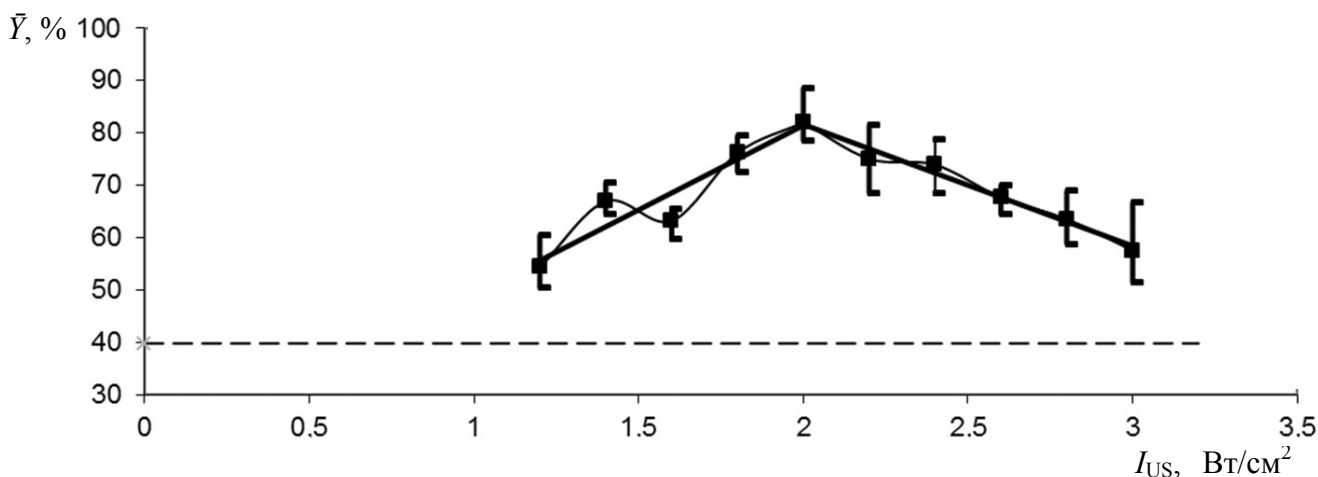


Рис. 3. Зависимость величин выхода ДНК от интенсивности ультразвука при сорбции на магнитных частицах. — выход при различной интенсивности УЗ воздействия; - - - - - выход ДНК без УЗ воздействия

Увеличение выхода НК с увеличением I_{US} обусловлено ускорением массообменных процессов, вызванным возникновением акустических течений разного масштаба. В то же время известно, что при проведении адсорбции на частицах для улучшения связывания на поверхности микросфер рекомендуется мягкое перемешивание, тогда как интенсивное перемешивание (в случае применения ультразвуковых ванн и образования вихрей) может отрывать большое количество адсорбированного вещества от поверхности микросфер [53].

Оценка необратимой сорбции на магнитных частицах затруднена, т. к. спектрофотометрический анализ пробы ДНК, содержащей магнитные частицы, ненадежен из-за многократного переотражения от силикатной поверхности частиц. Тем не менее по результатам анализа пробы после сорбции необратимое связывание пренебрежимо мало, т. к. несорбированный целевой продукт обнаруживается при повторном пропускании той же пробы и выделения из нее ДНК при интенсивности 2.0–2.2 Вт/см², лежит в пределах 1–3 % от общего количества, что соизмеримо с размером погрешностей.

Максимальное изменение температуры даже при интенсивности 3.0 Вт/см² не превышало 5 °С.

Влияние интенсивности ультразвука на целостность молекул НК

Следует отметить, что уменьшение выхода НК при увеличении интенсивности ультразвука может объясняться не только влиянием потоков (настолько сильных, что они вызывают "хаотическое" перемещение тяжелых частиц сорбента по всему объему пробы) и связанных с этим возможным уменьшением сорбции и/или увеличением десорб-

ции, но и возможной фрагментацией/деструкцией НК в этих условиях. Метод фрагментации ДНК с использованием низкочастотного ультразвука распространен достаточно широко, однако в ряде работ исследовано влияние на молекулы ДНК УЗП мегагерцовых частот и сообщается о возможности фрагментации молекул в этих условиях (при высокой интенсивности ультразвука) [54–56]. Предложен метод фрагментации, применимый только к растворам очищенной НК и основанный на действии фокусированного ультразвука в присутствии частиц различной природы и размера [57]. Отмечено, что в этих условиях избыточное озвучивание может резко уменьшить среднюю длину фрагментов до величины ниже длины ампликона, уменьшая чувствительность методов ПЦР [57].

Для выяснения самой возможности деградации НК при озвучивании в нашем устройстве (рис 1, б) выполнен электрофорез исследуемой плазмиды при минимальной, средней и максимальной интенсивностях ультразвука и различном времени воздействия (1, 5 и 10 мин). Результаты электрофореза исследуемой плазмиды после воздействия УЗП представлены на рис. 4. По результатам электрофореза можно сделать вывод о том, что полное разрушение плазмиды происходит при интенсивностях ультразвука в диапазоне $2.0 < I_{US} \leq 3.0$ Вт/см² только при времени озвучивания более 1 мин (5 мин и более).

По результатам электрофоретического анализа плазмиды можно предположить о частичной фрагментации плазмиды ДНК на интенсивности 3.0 Вт/см² в течение 1 минуты, при этом достоверно оценить длину фрагментов на данном электрофорезе не представляется возможным.

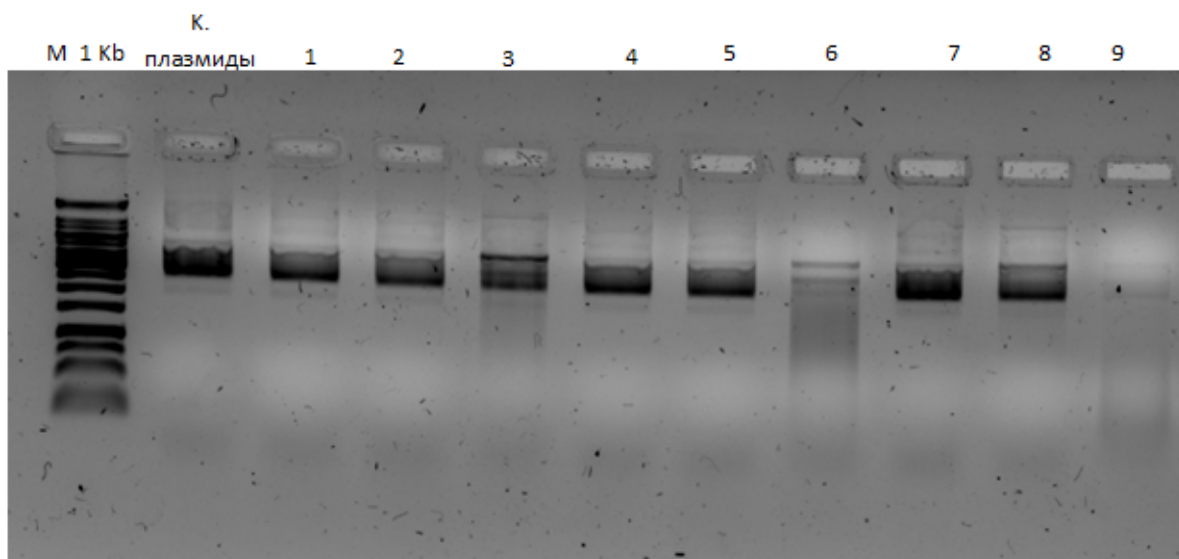


Рис. 4. Электрофорез плазмиды после ультразвукового воздействия при разных интенсивности и времени озвучивания.

1 — 1.2 Вт/см², 1 мин; 2 — 2.0 Вт/см², 1 мин; 3 — 3.0 Вт/см², 1 мин; 4 — 1.2 Вт/см², 5 мин; 5 — 2.0 Вт/см², 5 мин; 6 — 3.0 Вт/см², 5 мин; 7 — 1.2 Вт/см², 10 мин; 8 — 2.0 Вт/см², 10 мин; 9 — 3.0 Вт/см², 10 мин

Табл. 3. Относительная эффективность выделения ДНК на магнитных частицах ($\bar{Y}_{\text{МЧ}}$) и на микроколонке ($\bar{Y}_{\text{МК}}$) при различной интенсивности ультразвука. $s_{\text{МК}}$ и $s_{\text{МЧ}}$ — соответствующие стандартные отклонения

Основные характеристики	$I_{\text{УС}}, \text{Вт/см}^2$										
	0.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0
$\bar{Y}_{\text{МЧ}} / \bar{Y}_{\text{МК}}$	1.02	1.26	1.24	1.01	1.00	1.00	1.05	1.17	1.30	1.54	1.72
$s_{\text{МК}}$	4.5	4.9	4.7	5.4	4.0	3.6	4.3	4.2	5.0	4.2	3.3
$s_{\text{МЧ}}$	3.2	3.4	1.8	2.0	2.3	3.2	4.2	3.4	2.0	3.5	4.4

Сравнение эффективности выделения НК при сорбции на микроколонках и магнитных частицах

Сравнение средних значений выхода НК, полученных при использовании магнитных частиц и микроколонок, показывает (табл. 3, рис. 5), что в диапазоне $I_{\text{УС}} = 1.6 \div 2.2 \text{ Вт/см}^2$ оба эти способа приводят к одинаковым результатам, однако наибольший выход НК (82 %) в обоих случаях достигается при интенсивности УЗП 2.0 Вт/см². Тенденция к увеличению значений стандартных отклонений при сорбции на магнитных частицах при $I_{\text{УС}} \geq 2.2 \text{ Вт/см}^2$, может свидетельствовать о неоднородности условий сорбции в результате изменения вкладов разных эффектов ультразвука.

Однако увеличение выхода НК при сорбции на магнитных частицах при $I_{\text{УС}} \geq 2.2 \text{ Вт/см}^2$ по сравнению с выходом при сорбции на микроколонках свидетельствует о более "мягких" условиях сорбции в этом случае. Эти мягкие условия могут создаваться при сборе частиц в узлах стоячей волны, в которых механические напряжения минимальны. (Об этом свидетельствует отсутствие гемолиза эритроцитов и мелких организмов в таких условиях при небольшом времени озвучивания [27]).

Кроме того, выявленная недавно способность ДНК агрегировать магнитные частицы, покрытые двуокисью кремния, в магнитном поле [58] позволяет предположить возможность образования таких же агрегатов в условиях сочетания стоячей

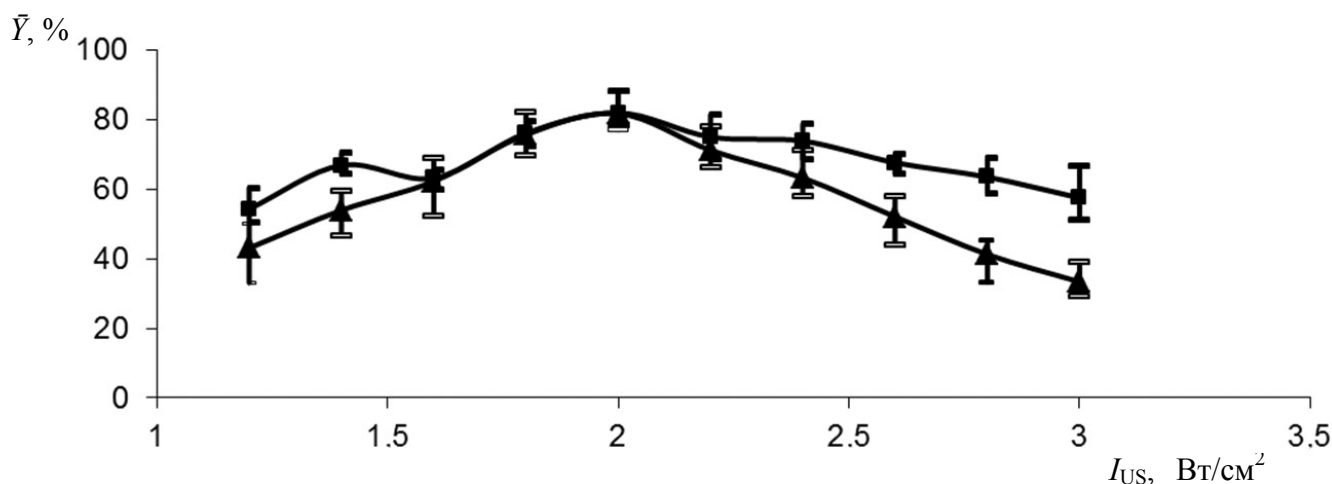


Рис. 5. Зависимость выхода ДНК от интенсивности ультразвука при сорбции на микроколонке (▲) и магнитных частицах (■)

волны с акустическим течением, что может обеспечить лучшую сохранность адсорбированных молекул. Показано также, что лучшая стабилизация плазмид относительно деградации и при кратковременном озвучивании, и при сдвиговых напряжениях в вихревом потоке происходит в присутствии конденсирующих агентов [59], а повреждения при озвучивании плазмидной ДНК уменьшаются при образовании комплексов молекул с липосомами [60].

Вопрос о выборе метода выделения плазмидной ДНК *M. tuberculosis* с помощью микроколонок или магнитных частиц производства ЗАО "Синтол" и озвучивания при интенсивности ультразвука 2.0 Вт/см² должен решаться в зависимости скорее от удобства использования и типа имеющихся у пользователей наборов, чем от различий в эффективности выделения.

Таким образом, при работе с пробами, содержащими минимальное количество нерастворимых примесей, работать удобнее с микроколонками, т. к. основной их недостаток заключается в забивании верхнего слоя стекловолоконной мембраны и, как следствие, очень низкой эффективности выделения ДНК из "грязной" пробы. Напротив, в случае водного раствора ДНК процесс выделения с помощью микроколонки прост, удобен и дешев, в сравнении с выделением на магнитных частицах (меньше реагентов, меньше стадий выделения, меньше манипуляций дозатором).

Но в случае работы с пробами, имеющими нерастворимые примеси, возможность магнитного сорбента удерживать ДНК в рабочем объеме при смене растворов является очень существенным преимуществом, и способно обеспечить стабильно

высокую эффективность выделения ДНК при соблюдении методики.

По результатам наших исследований можно сделать вывод, что ультразвуковое воздействие способно заменить температурное, без потери эффективности, при выделении ДНК.

Таким образом, может быть достигнуто существенное сокращение общего времени выделения (нет необходимости предварительного включения нагревательного оборудования), существует возможность применения в присутствии большого количества нерастворимых примесей, т. к. визуально-наблюдаемые гидродинамические эффекты являются подтверждением "ультразвукового перемешивания", которое создает условия для эффективного направленного массопереноса по всему объему кюветы при интенсивностях ультразвука в диапазоне 1.8–2.6 Вт/см².

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние 2.65 МГц фокусированного ультразвукового поля на выход ДНК *M. tuberculosis* при использовании модельных растворов и коммерческих наборов на основе силикатных микроколонок и магнитных частиц в диапазоне интенсивности ультразвука 1.2–3.0 Вт/см². Показано, что в обоих случаях величина выхода сначала увеличивается пропорционально интенсивности ультразвукового поля, а после достижения максимума изменяется обратно пропорционально интенсивности. Максимальное значение выхода и при сорбции на микроколонках, и при сорбции на магнитных частицах составляет 82 % при ин-

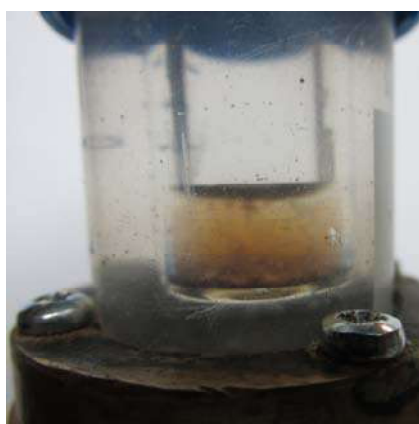
тенсивности 2.0 Вт/см^2 . Таким образом, выделение ДНК в 2 раза эффективнее, чем в отсутствие ультразвука, и на 10 % выше, чем при оптимальной температуре 70°C .

Визуальные наблюдения и фотосъемка позволили оценить структуру акустического поля и акустического течения при озвучивании суспензии магнитных частиц и ее изменение во времени при различных интенсивностях поля. Проведено краткое обсуждение влияния на сорбцию ДНК на микроколонке некоторых физических эффектов, возникающих при пропускании жидкости через пористые среды в ультразвуковом поле. На основе литературных данных и электрофореза оценена возможность фрагментации и деструкции молекул

ДНК в изученных условиях. Показано, что полное разрушение плазмиды происходит при интенсивностях ультразвука в диапазоне $2.0 < I_{\text{US}} \leq 3.0 \text{ Вт/см}^2$ только при времени озвучивания более 1 мин (5 мин и более).

На основании сравнения данных о выходе ДНК в изученных сорбционных системах сделан вывод, что выбор метода выделения плазмидной ДНК *M. tuberculosis* с помощью микроколонок или магнитных частиц производства ЗАО "Синтол" и озвучивания при интенсивности ультразвука 2.0 Вт/см^2 должен решаться в зависимости скорее от удобства использования и типа имеющихся у пользователей наборов, чем от различий в эффективности выделения.

ПРИЛОЖЕНИЕ



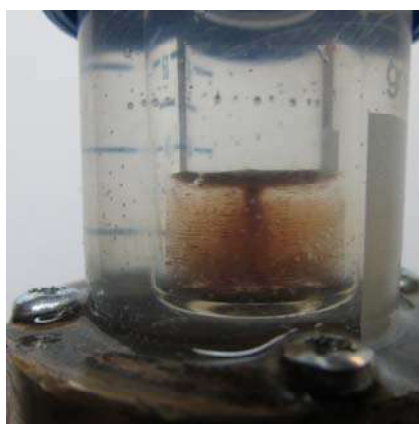
а



б



в



г



д



е

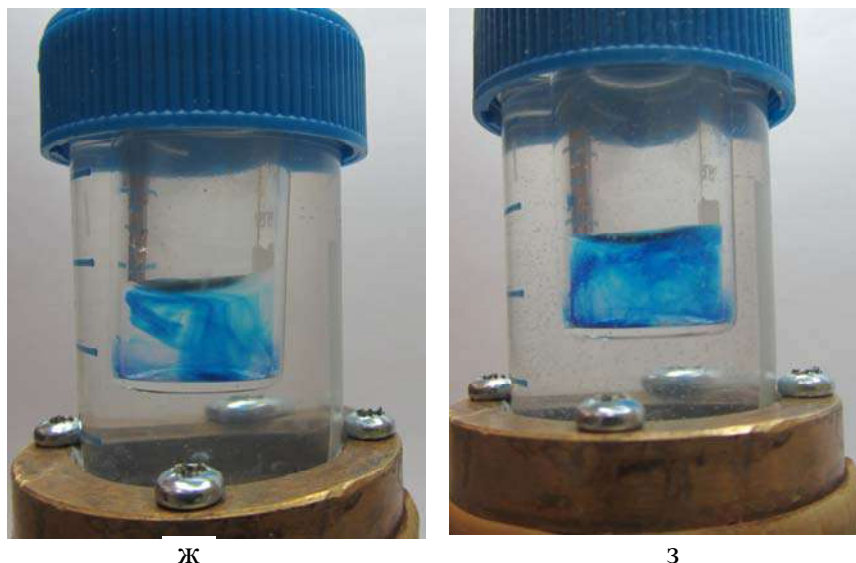


Рис. 2. Фотографии, иллюстрирующие некоторые эффекты, визуально наблюдаемые при озвучивании магнитных частиц в жидкости (пробе).

а — озвучивание магнитных частиц в жидкости, I_{US} 1.4–1.8 Вт/см², 0–5 с; б — озвучивание магнитных частиц в жидкости, I_{US} 1.4–1.8 Вт/см², 45–60 с; в — озвучивание магнитных частиц в жидкости, I_{US} 1.4–1.8 Вт/см², 5–45 с; г — озвучивание магнитных частиц в жидкости, I_{US} 2.0–2.4 Вт/см², 30–60 с; д — озвучивание магнитных частиц в жидкости, I_{US} 2.6–3.0 Вт/см², 0–60 с; е — озвучивание пробы с красителем, I_{US} 1.4–1.8 Вт/см², 0–5 с; ж — озвучивание пробы с красителем, I_{US} 1.8–2.4 Вт/см², 0–5 с; з — озвучивание пробы с красителем, I_{US} 2.8–3.0 Вт/см², 0–5 с

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rudi K., Kroken M., Dahlberg O.J. et al. Rapid, universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads // *Bio Techniques*. 1997. Vol. 22, no. 3. P. 506–511.
2. Malic L., Herrmann M., Hoa X.D., Tabrizian M. Current state of intellectual property in microfluidic nucleic acid analysis // *Recent Patents on Engineering*. 2007. Vol. 1. P. 71–88.
3. Moroney V., Martinez H., Callahan H. et al. Magnetic bead based soil DNA isolation using the epMotion® and ClearMag™ technology // *Eppendorf*. Application Note. No. 278. May 2013 (4 pages).
4. Pai A., Khachaturian A., Chapman S. et al. A handheld magnetic sensing platform for antigen and nucleic acid detection // *Analyst*. 2014. Vol. 139. P. 1403–1411.
5. Gröschl M. Ultrasonic separation of suspended particles. Part I. Fundamentals // *Acustica*. 1998. Vol. 84, no. 3. P. 432–447.
6. Coakley W.T., Hawkes J.J., Sobanski M.A. et al. Analytical scale ultrasonic standing wave manipulation cells and microparticles // *Ultrasonics*. 2000. Vol. 38. P. 638–641.
7. Kuznetsova L.A., Coakley W.T. Applications of ultrasound streaming and radiation force in biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. 2007. Vol. 22, no. 8. P. 1567–1577.
8. Schram C.J. Process for controlling a reaction by ultrasonic standing wave. Патент США N 4879011, 07.11.1989.
9. Yasuda K., Kiyama M., Umemura S-I., Takeda K. Deoxyribonucleic acid concentration using acoustic radiation force // *JASA*. 1996. Vol. 99, no. 2. P. 1248–1251.
10. Wiklund M., Green R., Ohlin M. Acoustofluidics 14: Applications of acoustic streaming in microfluidic devices // *Lab Chip*. 2012. Vol. 12, no. 14. P. 2438–2451.
11. Kuznetsova L.A., Mullen W.H., Rudell C.J., Birch P. Extraction and purification of biological cells using ultrasound. Патент EP N 2209545, 28.07.2010.
12. James A., Laugharn Jr. Method and apparatus for material separation using acoustic energy. Патент США 2010/0197894, 5 Aug. 2010.
13. Durin G., Chabaud S., Delattre C., Jary D. Device and method for isolating biological or chemical targets. Патент US N 8703434B2, 22.04.2014.
14. Dzheloda R.Kh., Petrov D.G., Shkinev V.M., Spivakov B.Ya. DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by polymerase chain reaction detection // *Mendeleev Commun.* 2017. Vol. 27. P. 302–303.

15. *Birch P., Joseph D., Bond P., Stanley C.J.* Ultrasound & magnetic method. Патент WO N 2011027146, 10.03.2011.
16. Патент WO N 2010102301, 10.09.2010.
17. *Glynn-Jones P., Hill M.* Acoustofluidics 23: Acoustic manipulation combined with other force fields // *Lab. Chip*. 2013. Vol. 13, no. 6. P. 1003–1010.
18. *Michele R., Stone M.R.* Method for releasing genetic material from solid phase. Патент US N 2008124777, 29.05.2008.
19. *Preiss-Bloom O., Tomer G.* Modification of enzymatic crosslinkers for controlling properties of crosslinked matrices. Патент US N 2011077388A1, 31.03.2011.
20. *Joseph D.T., Perry M.P.* Method for improved DNA release from binding substrates and/or decreasing PCR inhibition in pathogen detection. Патент WO N 2012125710A1, 20.09.2012.
21. *Петров Д.Г., Макарова Е.Д., Корнева Н.А., Альдекеева А.С., Князьков Н.Н.* Воздействие полей разной природы на выход ДНК при выделении из модельных растворов на двуокиси кремния. 1. Влияние температуры // *Научное приборостроение*. 2015. Т. 25, № 2. С. 91–101.
URL: <http://213.170.69.26/mag/2015/abst2.php#abst9>.
22. *Архангельский М.Е.* Воздействие акустических колебаний на процесс диффузии // *Успехи физических наук*. 1967. Т. 92, № 2. С. 181–206.
23. *Martin C.J., Law A.N.R.* The use of thermistor probes to measure energy distribution in ultrasound fields // *Ultrasonics*. 1980. Vol. 18, no. 3. P. 127–133.
24. *Пашиовкин Т.Н., Шильников Г.В.* Регистрация и анализ распределений интенсивностей в ультразвуковых пучках с использованием красителей // *Научное приборостроение*. 2000. Т. 10, № 3. С. 17–26. URL: <http://213.170.69.26/mag/2000/abst3.php#abst2>.
25. *Boyle R.W.* *Ultrasonics* // *Science Progress*. 1928. Vol. 23. P. 75–105.
26. *Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др.* Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) // *Научное приборостроение*. 2006. Т. 16, № 3. С. 132–136. URL: <http://213.170.69.26/mag/2006/abst3.php#abst15>.
27. *Harvey E.N., Loomis A.L.* High frequency sound waves of small intensity and their biological effects // *Nature*. 1928. Vol. 121. P. 622–624.
28. *Haydock D., Yeomans J.M.* Acoustic enhancement of diffusion in porous material // *Ultrasonics*. 2003. Vol. 41, no. 7. P. 531–538.
29. *Poesio P., Ooms G., Barake S.* An investigation of the influence of acoustic waves on the liquid flow through a porous material // *J. Acoust. Soc. Am.* 2002. Vol. 111, no. 5. P. 2019–2025.
30. *Poesio P., Ooms G.* Influence of high-frequency acoustic waves on the flow of a liquid through porous material: experimental and theoretical investigation // *IUTAM Proc. on Physicochemical and Electromechanical Interactions in Porous Media* / Huyghe J.M. et al. (eds.). Vol.125. Springer, 2005. P. 61–66.
31. *Breitbart M., Bathen D.* Influence of ultrasound on adsorption processes // *Ultrason. Sonochem.* 2001. Vol. 8, no 3. P. 277–283.
32. *Fedchenia I.I.* Acoustic Acceleration of Fluid Mixing in Porous Materials. Патент US N 2013/0201781, 08.08.2013.
33. *Jacobson G.* Use of acoustic waves in semiconductor manufacturing equipment optimization. Патент US 2013/0036969, 14.02.2013.
34. *Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G. et al.* Microchip-based purification of DNA from biological samples // *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75. P. 1880–1886.
35. *Tozak K.Ö., Erzenin M., Sargin İ., Ünlü N.* Sorption of DNA by Diatomite-Zn (II) embedded supermacroporous monolithic P (HEMA) cryogels // *EXCLI Journal*. 2013. Vol. 12. P. 670–678.
36. *Ager K., Latulippe D.R., Zydney A.L.* Plasmid DNA transmission through charged ultrafiltration membranes // *J Membrane Science*. 2009. Vol. 344, no. 1-2. P. 123–128.
37. *Shui L., Sparreboom W., Bomer J.G. et al.* Low pressure microfluidic-based DNA fragmentation // 15th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. 2–6 Oct. 2011, Seattle, Washington, USA. P. 1191–1193.
38. *Levy M.S., Collins I.J., Yim S.S. et al.* Effect of shear on plasmid DNA in solution // *Bioprocess Engineering*. 1999. Vol. 20, no. 1. P. 7–13. Doi: 10.1007/s004490050552.
39. *Joneja A., Huang X.* A device for automated hydrodynamic shearing of genomic DNA // *Biotechniques*. 2009. Vol. 46, no. 7. P. 553–556.
40. *Li L., Jin M., Sun C., Wang X. et al.* High efficiency hydrodynamic DNA fragmentation in a bubbling system // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. P. 40745 (9 pages). Doi: 10.1038/srep40745.
41. *Okabe Y., Lee A.P.* LCAT DNA shearing // *Journal of Laboratory Automation*. 2014. Vol. 19, no. 2. P. 163–170.
42. *Patel M.V., Tovar A.R., Lee A.P.* Lateral cavity acoustic transducer as an on-chip cell/particle microfluidic switch // *Lab Chip*. 2012. Vol. 12, no. 1. P. 139–145.
43. *Obara H., Kudo N., Shimizu K.* Visualization of therapeutic ultrasound fields in small chamber using image subtraction schlieren technique // *Proceedings of Symposium on Ultrasonic Electronics*. 13–15 November 2012. Vol. 33, no. 2P5-10. P. 249–250.
44. *Kudo N.* Effect of water surface conditions on standing wave fields generated inside a small chamber // *J Therapeutic Ultrasound*. 2014. Vol. 2 (Suppl. 1). Paper A23.
45. *Wood R.W., Loomis A.L.* The physical and biological effects of high-frequency sound waves of great intensity // *Phil. Mag. (Series 7)*. 1927. No. 4. P. 417–436.
46. *Mitome H.* Study of the generation mechanism of an acoustic jet through visualization experiments // *Japan. J. Appl. Phys.* 1991. Vol. 30. Suppl.30-1. P. 60–62.
47. *Spengler J.F., Coakley W.T., Christensen K.T.* Microstreaming effects on particle concentration in an ultrasonic standing wave // *AIChE J.* 2003. Vol. 49. P. 2773–2782.
48. *Kuznetsova L.A., Coakley W.T.* Microparticle concentration in short path length ultrasonic resonators: Role of radiation pressure and acoustic streaming // *J. Acoust. Soc. Am.* 2004. Vol. 116, no. 4. P. 1956–1966.
49. *Ультразвуковая технология / Под ред. проф. Б.А. Аграната. М.: Металлургия, 1974. 504 с.*

50. *Kentish S., Ashokkumar M.* The enhancement of mass transport processes using ultrasound // 19th Int. Congress on Acoustics. Madrid, 2–7 Sept. 2007. (5 pages).
51. *Spengler J., Jekel M.* Ultrasound conditioning of suspensions – studies of streaming influence on particle aggregation on a lab- and pilot-plant scale // *Ultrasonics*. 2000. Vol. 38, no. 1-8. P. 624–628.
52. *Mitome H., Kozuka T., Tuziuti T.* Measurement of the establishment process of acoustic streaming using laser Doppler velocimetry // *Ultrasonics*. 1996. Vol. 34, no. 2. P. 527–530.
53. Working with Microspheres. TechNote 201, Bangs Laboratories, Inc., 10 April 2008. 20 pages.
54. *Hawley S.A., Macleod R.M., Dunn F.* Degradation of DNA by intense, noncavitating ultrasound // *J. Acoust. Soc. Am.* 1963. Vol. 35, no. 8. P. 1285–1287.
55. *Гроховский С.Л.* Специфичность расщепления ДНК ультразвуком // *Молекулярная биология*. 2006. Т. 40, № 2. С. 317–325.
56. *Eshoo M.W., Picuri J., Hang A.T., Smith H.L., Meijering B., Bruyninckx M., Dobbelaer I.* Ultrasonics for microfluidic sample preparation. Патент WO N 2016/065299, 28.04.2016.
57. *Bashkurov V.I., Ulmanella U., Eason R.G., Taft B.* Methods and apparatuses for nucleic acid shearing by sonication. Патент US N 9127306, 8.09.2015.
58. *Liu Q., Li J., Liu H. et al.* Rapid cost-effective DNA quantification via a visually-detectable aggregation of superparamagnetic silica-magnetic nanoparticles // *Nano Research*. 2014. Vol. 7, no. 5. P. 755–784. Doi: 10.1007/s12274-014-0436-9.
59. *Wu M.L., Freitas S.S., Monteiro G.A. et al.* Stabilization of naked and condensed plasmid DNA against degradation induced by ultrasounds and high-shear vortices // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2009. Vol. 53, no. 4. P. 237–246. Doi: 10.1042/BA20080215.
60. *Wasan E.K., Reimer D.L., Bally M.B.* Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes // *J Pharm. Sci.* 1996. Vol. 85, no. 4. P. 427–433.

Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург (Петров Д.Г., Макарова Е.Д., Антифеев И.Е., Константинова Н.Н., Малышин С.Н.)

Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации. Санкт-Петербург (Бродская А.В.)

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (Бродская А.В.)

Контакты: *Петров Дмитрий Григорьевич*, dimoon88@mail.ru

Материал поступил в редакцию: 18.10.2017

INFLUENCE OF DIFFERENT KIND EXTERNAL FIELDS ON DNA YIELD AT ISOLATION ON SILICA FROM MODEL SOLUTIONS. EFFECT OF ULTRASOUND

**D. G. Petrov¹, E. D. Makarova¹, I. E. Antifeev¹,
A. V. Brodskaya^{2,3}, N. N. Konstantinova¹, S. N. Malyshev¹**

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia*

²*Ministry of Healthcare of the Russian Federation Research Institute of Influenza, Saint-Petersburg, Russia*

³*Peter The Great St. Petersburg Polytechnic University, Russia*

The effect of 2.65 MHz focused ultrasound on *M. tuberculosis* DNA yield with the use of commercial silica microcolumns and magnetic particles from the model solutions was studied over an ultrasound intensity range from 1.2 to 3.0 W/cm². The study revealed that in both cases DNA yields are linearly proportional to the ultrasound intensity but upon reaching maximum values, the yields are inversely related to the intensity. In either case the DNA yield peaks 82 % at intensity of 2.0 W/cm². Hence isolation of DNA outperforms by a factor of 2 as compared with the absence of ultrasound; it is 10 % greater than the DNA yield at optimal temperature 70 °C.

Visual observation and photo-, video-recording offer a clear view of acoustic field structure as well acoustic streaming patterns with time, at ultrasound processing of magnetic particles as the intensity increases. Consideration is being briefly given to some physic effects on DNA microcolumn adsorption in the course of the liquid passage through porous media during ultrasound processing. Using the literature data and electrophoresis the possibility of DNA fragmentation/destruction is assessed under the test conditions. It was not until about 3.0 W/cm² that plasmid destruction has been going with the time period in excess of 1 minute.

It is concluded that choosing between the adsorption systems involved is basically determined by convenience in operation and availability rather than the system performance.

Keywords: nucleic acids, effect of ultrasound, DNA separation, DNA purification, DNA concentration, silica magnetic particles

REFERENCES

1. Rudi K., Kroken M., Dahlberg O.J. et al. Rapid, universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads. *Bio Techniques*, 1997, vol. 22, no. 3, pp. 506–511.
2. Malic L., Herrmann M., Hoa X.D., Tabrizian M. Current state of intellectual property in microfluidic nucleic acid analysis. *Recent Patents on Engineering*, 2007, vol. 1, pp. 71–88.
3. Moroney V., Martinez H., Callahan H. et al. Magnetic bead based soil DNA isolation using the epMotion® and ClearMag™ technology. *Eppendorf. Application Note*, no. 278, May 2013 (4 pages).
4. Pai A., Khachaturian A., Chapman S. et al. A handheld magnetic sensing platform for antigen and nucleic acid detection. *Analyst*, 2014, vol. 139, pp. 1403–1411.
5. Gröschl M. Ultrasonic separation of suspended particles. Part I. Fundamentals. *Acustica*, 1998, vol. 84, no. 3, pp. 432–447.
6. Coakley W.T., Hawkes J.J., Sobanski M.A. et al. Analytical scale ultrasonic standing wave manipulation cells and microparticles. *Ultrasonics*, 2000, vol. 38, pp. 638–641.
7. Kuznetsova L.A., Coakley W.T. Applications of ultrasound streaming and radiation force in biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, vol. 22, no. 8, pp. 1567–1577.
8. Schram C.J. *Process for controlling a reaction by ultrasonic standing wave*. Patent US N 4879011, 07.11.1989.
9. Yasuda K., Kiyama M., Umemura S-I., Takeda K. Deoxyribonucleic acid concentration using acoustic radiation force. *JASA*, 1996, vol. 99, no. 2, pp. 1248–1251.
10. Wiklund M., Green R., Ohlin M. Acoustofluidics 14: Applications of acoustic streaming in microfluidic devices. *Lab Chip*, 2012, vol. 12, no. 14, pp. 2438–2451.
11. Kuznetsova L.A., Mullen W.H., Rudell C.J., Birch P. *Extraction and purification of biological cells using ultrasound*. Patent EP N 2209545, 28.07.2010.
12. James A., Laugharn Jr. *Method and apparatus for material separation using acoustic energy*. Patent US 2010/0197894, 5 Aug. 2010.
13. Durin G., Chabaud S., Delattre C., Jary D. *Device and method for isolating biological or chemical targets*. Patent US N 8703434B2, 22.04.2014.
14. Dzhelodova R.Kh., Petrov D.G., Shkinev V.M., Spivakov B.Ya. DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by polymerase chain reaction detection. *Mendeleev Commun.*, 2017, vol. 27, pp. 302–303.
15. Birch P., Joseph D., Bond P., Stanley C.J. *Ultrasound & magnetic method*. Patent WO N 2011027146, 10.03.2011.
16. Patent WO N 2010102301, 10.09.2010.
17. Glynn-Jones P., Hill M. Acoustofluidics 23: Acoustic manipulation combined with other force fields. *Lab.*

- Chip*, 2013, vol. 13, no. 6, pp. 1003–1010.
18. Michele R., Stone M.R. *Method for releasing genetic material from solid phase*. Patent US N 2008124777, 29.05.2008.
 19. Preiss-Bloom O., Tomer G. *Modification of enzymatic crosslinkers for controlling properties of crosslinked matrices*. Patent US N 2011077388A1, 31.03.2011.
 20. Joseph D.T., Perry M.P. *Method for improved DNA release from binding substrates and/or decreasing PCR inhibition in pathogen detection*. Patent WO N 2012125710A1, 20.09.2012.
 21. Petrov D.G., Makarova E.D., Korneva N.A., Aldekeeva A.S., Knyazkov N.N. [Influence of different kind external fields on DNA yield at isolation on silica from model solutions. 1. Effect of temperature]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2015, vol. 25, no. 2, pp. 91–101. Doi: 10.18358/np-25-2-i91101.
 22. Archangel'skiy M.E. [Impact of acoustic vibrations on diffusion process]. *Uspechi fizicheskikh nauk* [Achievements of physical sciences], 1967, vol. 92, no. 2. pp. 181–206. (In Russ.).
 23. Martin C.J., Law A.N.R. The use of thermistor probes to measure energy distribution in ultrasound fields. *Ultrasonics*, 1980, vol. 18, no. 3, pp. 127–133.
 24. Pashovkin T.N., Shil'nikov G.V. [Registration and analysis of intensity distribution in ultrasonic beams using dyes]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2000, vol. 10, no. 3, pp. 17–26. URL: <http://213.170.69.26/en/mag/2000/abst3.php#abst2>. (In Russ.).
 25. Boyle R.W. Ultrasonics. *Science Progress*, 1928, vol. 23, pp. 75–105.
 26. Alekseev Ya.I., Belov Yu.V., Varlamov D.A. et al. [Devices for diagnostics of biological objects based on the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2006, vol. 16, no. 3. pp. 132–136. URL: <http://213.170.69.26/mag/2006/abst3.php#abst15>. (In Russ.).
 27. Harvey E.N., Loomis A.L. High frequency sound waves of small intensity and their biological effects. *Nature*, 1928, vol. 121, pp. 622–624.
 28. Haydock D., Yeomans J.M. Acoustic enhancement of diffusion in porous material. *Ultrasonics*, 2003, vol. 41, no. 7, pp. 531–538.
 29. Poesio P., Ooms G., Barake S. An investigation of the influence of acoustic waves on the liquid flow through a porous material. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2002, vol. 111, no. 5, pp. 2019–2025.
 30. Poesio P., Ooms G. Influence of high-frequency acoustic waves on the flow of a liquid through porous material: experimental and theoretical investigation. *IUTAM Proc. on Physicochemical and Electromechanical Interactions in Porous Media*. Huyghe J.M. et al. (eds.). 2005, vol. 125, Springer, pp. 61–66.
 31. Breitbach M., Bathen D. Influence of ultrasound on adsorption processes. *Ultrason. Sonochem.*, 2001, vol. 8, no. 3, pp. 277–283.
 32. Fedchenia I.I. *Acoustic Acceleration of Fluid Mixing in Porous Materials*. Patent US N 2013/0201781, 08.08.2013.
 33. Jacobson G. *Use of acoustic waves in semiconductor manufacturing equipment optimization*. Patent US 2013/0036969, 14.02.2013.
 34. Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G. et al. Microchip-based purification of DNA from biological samples. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, pp. 1880–1886.
 35. Tozak K.Ö., Erzengin M., Sargin İ., Ünlü N. Sorption of DNA by Diatomite-Zn (II) embedded supermacroporous monolithic P (HEMA) cryogels. *EXCLI Journal*, 2013, vol. 12, pp. 670–678.
 36. Ager K., Latulippe D.R., Zydney A.L. Plasmid DNA transmission through charged ultrafiltration membranes. *J Membrane Science*, 2009, vol. 344, no. 1-2, pp. 123–128.
 37. Shui L., Sparreboom W., Bomer J.G. et al. Low pressure microfluidic-based DNA fragmentation. *15th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. 2–6 Oct. 2011, Seattle, Washington, USA, pp. 1191–1193.
 38. Levy M.S., Collins I.J., Yim S.S. et al. Effect of shear on plasmid DNA in solution. *Bioprocess Engineering*, 1999, vol. 20, no. 1, pp. 7–13. Doi: 10.1007/s004490050552.
 39. Joneja A., Huang X. A device for automated hydrodynamic shearing of genomic DNA. *Biotechniques*, 2009, vol. 46, no. 7, pp. 553–556.
 40. Li L., Jin M., Sun C., Wang X. et al. High efficiency hydrodynamic DNA fragmentation in a bubbling system. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, pp. 40745 (9 pages). Doi: 10.1038/srep40745.
 41. Okabe Y., Lee A.P. LCAT DNA shearing. *Journal of Laboratory Automation*, 2014, vol. 19, no. 2, pp. 163–170.
 42. Patel M.V., Tovar A.R., Lee A.P. Lateral cavity acoustic transducer as an on-chip cell/particle microfluidic switch. *Lab Chip*, 2012, vol. 12, no. 1, pp. 139–145.
 43. Obara H, Kudo N, Shimizu K. Visualization of therapeutic ultrasound fields in small chamber using image subtraction schlieren technique. *Proceedings of Symposium on Ultrasonic Electronics*, 13–15 November 2012, vol. 33, no. 2P5-10, pp. 249–250.
 44. Kudo N. Effect of water surface conditions on standing wave fields generated inside a small chamber. *J Therapeutic Ultrasound*, 2014, vol. 2 (Suppl. 1), paper A23.
 45. Wood R.W., Loomis A.L. The physical and biological effects of high-frequency sound waves of great intensity. *Phil. Mag. (Series 7)*, 1927, no. 4, pp. 417–436.
 46. Mitome H. Study of the generation mechanism of an acoustic jet through visualization experiments. *Japan. J. Appl. Phys.*, 1991, vol. 30, Suppl.30-1, pp. 60–62.
 47. Spengler J.F., Coakley W.T., Christensen K.T. Microstreaming effects on particle concentration in an ultrasonic standing wave. *AIChE J.*, 2003, vol. 49, pp. 2773–2782.
 48. Kuznetsova L.A., Coakley W.T. Microparticle concentration in short path length ultrasonic resonators: Role of radiation pressure and acoustic streaming. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2004, vol. 116, no. 4, pp. 1956–1966.
 49. Agranat B.A. (ed.). *Ul'trazvukovaya tekhnologiya* [Ultrasonic technology]. Moscow, Metallurgiya Publ., 1974. 504 p.
 50. Kentish S., Ashokkumar M. The enhancement of mass transport processes using ultrasound. *19th Int. Congress on Acoustics*. Madrid, 2–7 Sept. 2007. (5 pages).

51. Spengler J., Jekel M. Ultrasound conditioning of suspensions – studies of streaming influence on particle aggregation on a lab- and pilot-plant scale. *Ultrasonics*, 2000, vol. 38, no. 1-8, pp. 624–628.
52. Mitome H., Kozuka T., Tuziuti T. Measurement of the establishment process of acoustic streaming using laser Doppler velocimetry. *Ultrasonics*, 1996, vol. 34, no. 2, pp. 527–530.
53. *Working with Microspheres*. TechNote 201, Bangs Laboratories, Inc., 10 April 2008. 20 pages.
54. Hawley S.A., Macleod R.M., Dunn F. Degradation of DNA by intense, noncavitating ultrasound. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1963, vol. 35, no. 8, pp. 1285–1287.
55. Grochovskiy S.L. [Specificity of decomposition of DNA ultrasound]. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular biology], 2006, vol. 40, no. 2, pp. 317–325. (In Russ.).
56. Eshoo M.W., Picuri J., Hang A.T., Smith H.L., Meijering B., Bruyninckx M., Dobbelaer I. *Ultrasonics for microfluidic sample preparation*. Patent WO N 2016/065299, 28.04.2016.
57. Bashkirov V.I., Ulmanella U., Eason R.G., Taft B. *Methods and apparatuses for nucleic acid shearing by sonication*. Patent US N 9127306, 8.09.2015.
58. Liu Q., Li J., Liu H. et al. Rapid cost-effective DNA quantification via a visually-detectable aggregation of superparamagnetic silica-magnetic nanoparticles. *Nano Research*, 2014, vol. 7, no. 5, pp. 755–784. Doi: 10.1007/s12274-014-0436-9.
59. Wu M.L., Freitas S.S., Monteiro G.A. et al. Stabilization of naked and condensed plasmid DNA against degradation induced by ultrasounds and high-shear vortices. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2009, vol. 53, no. 4, pp. 237–246. Doi: 10.1042/BA20080215.
60. Wasan E.K., Reimer D.L., Bally M.B. Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes. *J Pharm. Sci.*, 1996, vol. 85, no. 4, pp. 427–433.

Contacts: *Petrov Dmitriy Grigor'evich*,
dimoon88@mail.ru

Article received in edition: 18.10.2017